

## *Evaluación de Lípidos Extraídos de Microalgas Nannochloropsis Oculata para la Producción de Biodiesel*

Eliana Dagnino<sup>1</sup>, Carlos Medina<sup>1</sup>, María Beligni<sup>2</sup> y Ester Chamorro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica (QUIMOB), Facultad Regional Resistencia, Universidad Tecnológica Nacional, French, N°414, (3500) Argentina, mchamorro@frre.utn.edu.ar

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biológicas, (IIB-CONICET-UNMdP), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Juan B. Justo, N°2550, (7600) Argentina

**Resumen** - La creciente preocupación mundial por la escasez de combustibles fósiles, el aumento de los requerimientos energéticos y la protección del ambiente han llevado a la búsqueda de materias primas alternativas. En este contexto surgen las microalgas como fuente de lípidos para la producción de biodiesel. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición, por separación en columna cromatográfica, de los lípidos saponificables y no saponificables extraídos de la microalga *Nannochloropsis oculata* con solvente hexano, en equipo soxhlet, con el propósito de dar un aprovechamiento integral a esta materia prima de tercera generación. La caracterización y cuantificación de diferentes grupos de componentes presentes en los extractivos se realizó por cromatografía en placa y cromatografía de gases. Se lograron separar cinco grupos de lípidos: carotenos (2,59%), grasas (38,31%), aceites (10,82%) y lípidos de mayor polaridad (fosfolípidos, glicolípidos, xantófilas, clorofilas, etc.) (26,26%), quedando retenido en la columna cromatográfica aproximadamente el 22,02% de la masa atribuida a mucílagos y gomas, productos de degradación de los lípidos presentes.

**Palabras Claves:** Lípidos, microalgas, *Nannochloropsis oculata*, biodiesel

### *Evaluation of Lipids Extracted from Microalgae Nannochloropsis Oculata for Biodiesel Production*

**Abstract** - The growing global concern about the shortage of fossil fuels, increased energy requirements and environmental protection has led to the search for alternative raw materials. In this context, microalgae emerge as a source of lipids for biodiesel production. The aim of this study was to evaluate the composition, by column chromatographic separation, of saponifiable and unsaponifiable lipids extracted in soxhlet equipment with hexane solvent from *Nannochloropsis oculata* microalgae, with the aim of developing methods for the complete utilization of this third generation feedstock. The characterization and quantification of different sets of components present in the extraction was performed by Thin Layer Chromatography and Gas Chromatography. We were able to identify five families of lipids, identified as carotenes (2,59%), fat (38,31%), oil (10,82%) and higher polarity lipids (phospholipids, glycolipids, xanthophylls, chlorophylls, etc.) (26,26%), being retained in the chromatographic column approximately 22,02% of the mass attributed to gums and mucilages, lipids degradation products.

**Keywords:** Lipids, microalgae, *Nannochloropsis oculata*, biodiesel

### INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una creciente preocupación mundial por la escasez de combustibles fósiles y el

aumento de los requerimientos energéticos como así también por la protección del ambiente (Henry, 1998). Por otra parte en nuestro país, en el año 2007, fue sancionada la Ley Nro. 26093 que insti-

tuye el Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y Uso Sustentable de Biocombustibles (Senado y Cámara de Diputados de la Nación Argentina, 2006). Debido a ello se buscan materias primas alternativas, amigables con el medio ambiente, renovables y de alta disponibilidad que puedan asegurar un desarrollo sostenible.

En este contexto las microalgas presentan un gran número de ventajas: en condiciones de cultivo óptimas pueden duplicar su biomasa en horas, no necesitan tierra fértil, pueden generar entre 30 y 100 veces más aceite por hectárea que las plantas superiores (Posten y Schaub, 2009). Además las microalgas son una materia prima muy prometedora para la producción de biocombustibles y otras biomoléculas debido a su elevada productividad y capacidad de utilizar CO<sub>2</sub> y otros pasivos ambientales como alimento (Posten y Schaub, 2009). En particular *Nannochloropsis oculata*, una microalga marina, tiene la capacidad de almacenar por encima del 30% de lípidos saponificables en condiciones de estrés nutricional (Pieber, 2012).

Las microalgas comprenden un amplio grupo de microorganismos fotosintéticos unicelulares que viven en una vasta variedad de ambientes y climas. Son los principales constituyentes del fitoplancton por lo cual cumplen un rol primordial en la cadena trófica. Son un grupo polifilético ya que no descienden de un solo ancestro. Por ello existe una gran variedad de propiedades entre las microalgas incluyendo sus ciclos de vida, morfología, hábitats y metabolismo (Richmond, 2003; Matsunaga y col., 2005). Desde el punto de vista biotecnológico esto cobra gran importancia porque diferentes cepas de algas poseen capacidades muy variadas para crecer en cultivo y generar biomasa y productos deseados.

Son relativamente pocas las especies que han sido cultivadas a gran escala siendo las más estudiadas las de los géneros *Dunaliella* sp., *Haematococcus* sp., *Spirulina* sp. (cianobacteria), *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Scenedesmus* sp., *Schizochytrium* sp. y *Nannochloropsis* sp., entre otros. Los sistemas de crecimiento de microalgas más comunes son los piletones en forma de óvalos ("raceway"), por su bajo costo y su facilidad para ser llevados a escalas muy grandes. Cada unidad ronda entre los 500 y los 4000 m<sup>2</sup> y se lleva a escala mediante su replicación. Normalmente la columna de cultivo posee una pro-

fundidad máxima de 50 cm para permitir una mayor penetración de luz y es agitada para asegurar mejor aireación y acceso a nutrientes. En situaciones en que se desea controlar más las condiciones se utilizan biorreactores cerrados que arrojan mayores productividades pero a mucho mayor costo y con más dificultad de ser llevados a escala industrial (Jorquera y col., 2010; Zijffers y col., 2010).

Entre los productos que pueden obtenerse de microalgas se incluyen vitaminas, suplementos nutricionales, alimentos animales, colorantes y productos farmacéuticos (Harun, 2010). Las microalgas tienen además potencial para ser utilizadas en la producción de varios tipos de biocombustibles ya que, dependiendo del grupo, pueden acumular polisacáridos o lípidos como compuestos de reserva. Además deben tenerse en cuenta las condiciones de estrés nutricional debido a la cual la proporción de las sustancias de reserva se modifican adaptándose a un medio hostil. Entonces para la obtención de biodiesel es necesario crear un ambiente para que las microalgas produzcan altas concentraciones de lípidos debido al estrés nutricional, pero al mismo tiempo que la reproducción sea la necesaria para mantener el cultivo.

En cuanto a las metodologías para extracción de lípidos, varios autores han enfocado sus estudios al desarrollo y puesta a punto de diversas técnicas utilizadas no sólo para aceites de microalgas. Entre ellas podemos nombrar las físicas (presión), químicas (solventes o fluidos supercríticos), enzimas, shock osmótico, ultrasonido, entre otras (Lee y col., 2010).

Sin embargo el costo de este biocombustible actualmente supera ampliamente los niveles deseados. Por ello es necesario pensar en el aprovechamiento integral de esta biomasa (Singh y col., 2014).

En la búsqueda de las mejores condiciones de estrés nutricional para maximizar la concentración de lípidos aptos para la producción de biodiesel, el objetivo del presente trabajo, con el propósito de dar un aprovechamiento integral a esta materia prima de tercera generación, fue evaluar la composición de los lípidos saponificables y no saponificables extraídos de la microalga *N. oculata* con solvente hexano, en equipo soxhlet.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Materias primas*

En el presente trabajo de investigación se utilizaron microalgas de la especie *Nannochloropsis oculata* cultivadas en la ciudad de Mar del Plata durante los meses de setiembre-octubre de 2012. El cultivo se llevó a cabo con temperaturas y luz impuestas por el ambiente, en agua de mar natural esterilizada mediante cloración (20 ppm) y declorada con 1g de tiosulfato de sodio/g NaClO. El cultivo fue realizado enriqueciendo el agua de mar con medio Yashima modificado según la siguiente composición: 100g/t de  $\text{NaNO}_3$ , 10g/t de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 15g/t de urea y 50g/t de Clewat 32 (composición en porcentaje de peso en peso (%p/p) de cada componente fue la siguiente: 0,385%  $\text{FeCl}_2$ , 0,166%  $\text{ZnCl}_2$ , 0,775%  $\text{MnCl}_2$ , 0,017%  $\text{CoCl}_2$ , 0,007%  $\text{CuSO}_4$ , 0,632%  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 2,470%  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,005% EDTA.). Los cultivos fueron aireados mediante un blower ó bomba de aire trifásica.

Las microalgas fueron sometidas a estrés mediante dilución del medio de cultivo: para ello se tomó el 30% del cultivo descripto anteriormente, se pasó a otro tanque y se agregó el agua de mar tratada hasta igualar el volumen inicial sin el agregado de  $\text{NaNO}_3$  ni  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pero agregando las cantidades correspondientes de Clewat 32 (50g/t). Las microalgas fueron cultivadas en condiciones estresadas hasta que no se detectaron aumentos en biomasa, lo cual normalmente correspondía a 3-4 días desde el inicio del período de estrés. Para ello diariamente se realizaban conteos celulares en hemocitómetro bajo microscopio.

Finalizado el período de cultivo de microalgas estresadas se procedió a realizar la floculación de las mismas con  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  en una concentración de 100 ppm luego de lo cual se agitó durante 10 minutos a una velocidad de entre 30 y 80 rpm. Finalizada la agitación se dejaron sedimentar las microalgas alrededor de 30 min. El lodo obtenido fue centrifugado a 2000 g durante 10 min eliminado el sobrenadante. El lodo concentrado fue secado a 60°C con vacío durante aproximadamente 20 horas hasta sequedad.

### *Extracción de lípidos*

La extracción de lípidos de la microalga se llevó a cabo utilizando extracción continua en soxhlet

con solvente n-hexano calidad pro-análisis. El procedimiento consistió en colocar 10 g de biomasa en un cartucho de celulosa en la cámara del soxhlet y se realizó la separación sólido-líquido con 150 ml de solvente hexano. Se llevaron a cabo cuatro sifones. Posteriormente se recuperó el solvente mediante rotavapor y se pesó el extracto obtenido. El contenido de extraíbles en solvente hexano se expresó en porcentaje en base seca.

### *Separación de los componentes extractivos*

La separación de los componentes extraídos con hexano de la masa seca se realizó en columna cromatográfica de 25 cm rellena de alúmina Brockmann I, tamaño de partícula 150 mesh, tamaño de poro 58 Å y hexano, mezclas de hexano:éter de 3 a 100% y etanol 100% como fases líquida. Se utilizó lana de vidrio (Supelco) y arena lavada con ácido clorhídrico diluido y agua destilada y posteriormente calcinada como soportes de la alúmina. El empaquetamiento de la columna se realizó en húmedo colocando el solvente y luego el relleno. Por encima de éste se agregó arena tratada como soporte de la siembra. Se recolectaron aproximadamente 100 fracciones por cada extractivo, se concentraron en evaporador rotatorio y se pesaron.

### *Caracterización y cuantificación de lípidos*

La cuantificación de los diferentes grupos de componentes presentes en los extractivos de hexano se realizó por gravimetría, mientras que la caracterización por cromatografía en placa (TLC) y cromatografía de gases (GC), por comparación con muestras conocidas.

La cromatografía en placa se utilizó para evaluar cualitativamente la presencia de lípidos saponificables y no saponificables y el orden de elución en la columna cromatográfica rellena. Esta técnica se realizó sembrando los patrones y las muestras en Cromatofolios AL TLC 20 x 20 sílicagel 60 F254 utilizando n-hexano:éter etílico (95:5 hasta 70:30) como eluyente y permanganato de potasio acidificado al 1% como revelador.

Por último se caracterizaron cuidadosamente las diferentes fracciones por Cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu

modelo GC 14B, con una columna del tipo MEGA-BORE DB-1 P/N 125-7032 de 2 m de longitud y film 1,5  $\mu\text{m}$  inyectando 0,2  $\mu\text{l}$  de muestra y programación de temperatura de 100°C durante 1 minuto, luego incremento de 10°C por minuto hasta alcanzar la temperatura final de 320°C en la que permanece 10 minutos. La temperatura del inyector y del detector (FID) fue 320°C.

La composición de ácidos grasos fue analizada por cromatografía de gases masa en un equipo GC-MS Clarus 600/Clarus 600 T-Perkin Elmer en las siguientes condiciones: temperatura inicial del horno 75°C durante 3 min; rampa de temperatura de 10°C/min hasta alcanzar 290°C donde permaneció por 15 min; modo de inyección Split, relación de split 1:50; volumen de inyección 0,2  $\mu\text{l}$ ; temperatura del inyector 300°C; gas carrier He; Temperatura de interfase: 200°C; rango de adquisición de masa 30 a 500 Da. Se usó una Columna capilar ZB-5HT INFERNO (Zebron) de 30 m de longitud con un d. i. 250  $\mu\text{m}$  y 0,10  $\mu\text{m}$  de espesor de film.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Extracción de lípidos*

Se trabajó con el extracto obtenido de microalgas estresadas a partir de cuatro sifones en equipo soxhlet con n-hexano. Este extracto constituyó el 20% p/p sobre biomasa seca. Este contenido se incrementa con el número de sifones alcanzando hasta un 40 % p/p sobre base seca. Sin embargo el objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición de los lípidos saponificables y no saponificables extraídos de la microalga *N. oculata* con solvente hexano para un posible aprovechamiento integral del mismo.

### *Separación de los componentes extractivos*

En función de la naturaleza polar y el peso molecular de cada uno de los componentes que integraron el extractivo, al realizar la separación cromatográfica de los mismos se hallaron siete grupos de componentes bien diferenciados. Las proporciones de las fracciones según el orden de elución, expresadas como porcentaje en peso seco de la masa de la mezcla de extractivo, sembrada en la columna

cromatográfica fueron: 2,59%, 38,31%, 10,82%, 4,90%, 17,15% y 4,21%. Por otro lado la masa total eluida de la columna representó el 77,98% de la masa total sembrada quedando retenido en la columna cromatográfica el 22,02%. Esta fracción retenida puede ser atribuida a mucílagos y gomas producto de descomposición durante el secado.

Las primeras fracciones eluyeron rápidamente con solvente n-hexano 100% y mezclas n-hexano:éter etílico de 97:3 a 90:10 (carotenos) mientras que las fracciones de grasas y aceites lo hicieron con mezclas n-hexano:éter de 70:30 a 50:50. Posteriormente salieron las fracciones de lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos, xantinas) con mezclas del eluyente, n-hexano:éter, de 50:50 a 0:100. Finalmente con etanol 100% corrió la última porción.

### *Caracterización de lípidos*

Se lograron caracterizar seis grupos de lípidos, que en orden de elución fueron: carotenos, grasas, aceites y 3 fracciones diferentes de lípidos polares y/o de mayor peso molecular, potencialmente saponificables, del tipo fosfolípidos, glicolípidos y xantinas.

Mediante cromatografía TLC se pudieron distinguir los distintos componentes por su relación de frente. Además la grasa y el aceite se identificaron mediante la utilización de patrones. Las fracciones de grasas y de aceites, luego de eliminado el solvente, se diferenciaron por su estado de agregación, las primeras solidificaron en forma de sólido blanco y las segundas permanecieron como líquidos viscosos incoloros. La composición en ácidos grasos determinada por GC-MS indicó la presencia de ácido tetradecanoico (C14:0), ácido hexadecanoico (C16:0), ácido 9-hexadecenoico (C16:1), ácido 9,12-octadecadienoico (C18:2) y ácido 5,8,11,14,17-eicosapennificables y no saponificables y el orden de elución en la columna cromatográfica rellena. Esta técnica se realizó sembrando los patrones y las muestras en Cromatofolios AL TLC 20 x 20 silicagel 60 F254 utilizando n-hexano:éter etílico (95:5 hasta 70:30) como eluyente y permanganato de potasio acidificado al 1% como revelador.

Por último se caracterizaron cuidadosamente las diferentes fracciones por Cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu



modelo GC 14B, con una columna del tipo MEGA-BORE DB-1 P/N 125-7032 de 2 m de longitud y film 1,5  $\mu\text{m}$  inyectando 0,2  $\mu\text{l}$  de muestra y programación de temperatura de 100°C durante 1 minuto, luego incremento de 10°C por minuto hasta alcanzar la temperatura final de 320°C en la que permanece 10 minutos. La temperatura del inyector y del detector (FID) fue 320°C.

La composición de ácidos grasos fue analizada por cromatografía de gases masa en un equipo GC-MS Clarus 600/Clarus 600 T-Perkin Elmer en las siguientes condiciones: temperatura inicial del horno 75°C durante 3 min; rampa de temperatura de 10°C/min hasta alcanzar 290°C donde permaneció por 15 min; modo de inyección Split, relación de split 1:50; volumen de inyección 0,2  $\mu\text{l}$ ; temperatura del inyector 300°C; gas carrier He; Temperatura de interfase: 200°C; rango de adquisición de masa 30 a 500 Da. Se usó una Columna capilar ZB-5HT INFERNO (Zebron) de 30 m de longitud con un d. i. 250  $\mu\text{m}$  y 0,10  $\mu\text{m}$  de espesor de film.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Extracción de lípidos*

Se trabajó con el extracto obtenido de microalgas estresadas a partir de cuatro sifones en equipo soxhlet con n-hexano. Este extracto constituyó el 20% p/p sobre biomasa seca. Este contenido se incrementa con el número de sifones alcanzando hasta un 40 % p/p sobre base seca. Sin embargo el objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición de los lípidos saponificables y no saponificables extraídos de la microalga *N. oculata* con solvente hexano para un posible aprovechamiento integral del mismo.

### *Separación de los componentes extractivos*

En función de la naturaleza polar y el peso molecular de cada uno de los componentes que integraron el extractivo, al realizar la separación cromatográfica de los mismos se hallaron siete grupos de componentes bien diferenciados. Las proporciones de las fracciones según el orden de elución, expresadas como porcentaje en peso seco de la masa de la mezcla de extractivo, sembrada en la columna

cromatográfica fueron: 2,59%, 38,31%, 10,82%, 4,90%, 17,15% y 4,21%. Por otro lado la masa total eluida de la columna representó el 77,98% de la masa total sembrada quedando retenido en la columna cromatográfica el 22,02%. Esta fracción retenida puede ser atribuida a mucílagos y gomas producto de descomposición durante el secado.

Las primeras fracciones eluyeron rápidamente con solvente n-hexano 100% y mezclas n-hexano:éter etílico de 97:3 a 90:10 (carotenos) mientras que las fracciones de grasas y aceites lo hicieron con mezclas n-hexano:éter de 70:30 a 50:50. Posteriormente salieron las fracciones de lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos, xantinas) con mezclas del eluyente, n-hexano:éter, de 50:50 a 0:100. Finalmente con etanol 100% corrió la última porción.

### *Caracterización de lípidos*

Se lograron caracterizar seis grupos de lípidos, que en orden de elución fueron: carotenos, grasas, aceites y 3 fracciones diferentes de lípidos polares y/o de mayor peso molecular, potencialmente saponificables, del tipo fosfolípidos, glicolípidos y xantinas.

Mediante cromatografía TLC se pudieron distinguir los distintos componentes por su relación de frente. Además la grasa y el aceite se identificaron mediante la utilización de patrones. Las fracciones de grasas y de aceites, luego de eliminado el solvente, se diferenciaron por su estado de agregación, las primeras solidificaron en forma de sólido blanco y las segundas permanecieron como líquidos viscosos incoloros. La composición en ácidos grasos determinada por GC-MS indicó la presencia de ácido tetradecanoico (C14:0), ácido hexadecanoico (C16:0), ácido 9-hexadecenoico (C16:1), ácido 9,12-octadecadienoico (C18:2) y ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5).

Finalmente por TLC, variando la polaridad del eluyente, fueron evidenciados los restantes compuestos lipídicos separados por cromatografía en columna con altas concentraciones de éter.

## CONCLUSIONES

En los extractos hexánicos de microalga *N. oculata* se caracterizaron y cuantificaron diferentes

grupos de sustancias lipídicas de interés alimenticio, farmacéutico y cosmético. Se lograron separar carotenos (3,59%), grasas (38,31%), aceites (10,82%) y otros lípidos (fosfolípidos, glicolípidos, xantinas, etc.) (26,26%), quedando retenido en la columna cromatográfica aproximadamente el 22,02% de la masa atribuida a mucílagos y gomas. El aprovechamiento integral de los componentes de esta parte de la biomasa microalgal permitirá pensar en una disminución en los costos relativos para la producción de biodiesel.

### REFERENCIAS

- Henry, "Composition and toxicity of petroleum products and their additives", *Hum Exp Toxicol*, 17, 111-123, (1998).
- Senado y Cámara de Diputados de la Nación Argentina. Ley 26.093. Régimen de regulación y promoción para la producción y uso sustentables de biocombustibles. Sancionada el 19 de abril de 2006.
- Posten and Schaub, "Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels: a process view". *J Biotechnol*. 142, 64-69, (2009).
- Pieber, Schober and Mittelbach, "Pressurized fluid extraction of polyunsaturated fatty acids from the microalga *Nannochloropsis oculata*", *Biomass Bioenergy*, 47, 474-482, (2012).
- Richmond (Ed.), "Handbook of Microalgal Culture". Primera edición, Wiley-Blackwell; ISBN-10: 0632059532, (2003).
- Matsunaga, Takeyama, Miyashita and Yokouchi, "Marine microalgae", *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 96, 165-188, (2005).
- Jorquera, Kiperstok, Sales, Embiruçu and Ghirardi, "Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors", *Bioresour Technol*. 101, 1406-13, (2010).
- Zijffers, Schippers, Zheng, Janssen, Tramper and Wijffels, "Maximum Photosynthetic Yield of Green Microalgae in Photobioreactors", *Mar Biotechnol* (NY), 12, 708-718, (2010).
- Harun, Singh, Forde and Danquah, "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products", *Renewable Sustainable Energy Reviews*. 14, 1037-1047, (2010).
- Lee, Yoo, Jun, Ahn and Oh, "Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae", *Bioresour Technol*, 101, S75-S77, (2010).
- Singh, Guldhe, Rawat, Bux, "Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae", *Renewable Sustainable Energy Reviews*. 29, 216-245, (2014).